

原 著

<sup>35</sup>S-Methionine 取り込み後の薄層クロマトグラフィー  
 ——*Mycobacterium*, *Rhodococcus* および *Nocardia* の同定に  
 おける石油エーテル可溶画分の意義——

東 村 道 雄・水 野 松 司

国立療養所中部病院

受付 昭和 55 年 7 月 9 日

THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY AFTER INCUBATION WITH <sup>35</sup>S-METHIONINE

——Meaning of Petroleum Ether-Soluble Fraction as Aid to Identification  
 of *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, and *Nocardia*——

Michio TSUKAMURA\* and Shoji MIZUNO

(Received for publication July 9, 1980)

Previously, we reported that thin-layer chromatography of ethyl ether-ethanol extracts of mycobacteria after incubation with <sup>35</sup>S-methionine was useful for differentiation among mycobacterial species (Tsukamura, M. & Mizuno, S.: Int. J. Syst. Bacteriol., 25: 271-280, 1975; Kekkaku, 53: 85-89, 1978; Kekkaku, 54: 15-27, 1979). The method was also useful for differentiating rhodococci from nocardiae (Tsukamura, M. & Mizuno, S.: J. Gen. Microbiol., 105: 159-160, 1978). In the present study, the meaning of petroleum ether-soluble fraction has been studied, restricting the subject to this fraction.

The strains used are shown in Table 1. The test organisms of rhodococci were cultivated at 37°C for 5 days, nocardiae at 28°C for 5 days, and slowly growing mycobacteria at 37°C for 14 days. The organisms grown were harvested and washed three times with saline. A 100 mg (wet weight) sample of the organisms was suspended in the following reaction mixture: 4.0 ml of a M/15 phosphate buffer solution (pH 7.1) containing sodium acetate, 10 μg/ml, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 100 μg/ml, and L-<sup>35</sup>S-methionine, 10 μCi/ml. After incubation at 37°C for 24 hours, the cells were centrifuged, washed three times with 5 ml of distilled water, and extracted twice with 3.0 ml of ethyl ether-ethanol (1:1, in volume) mixture, each time for 5 minutes. The extracts were combined and allowed to stand at 37°C in an incubator until ca. 0.1 ml volume. To the concentrate, 4.0 ml of petroleum ether and 2.0 ml of distilled water were added and mixed. The resulting upper layer was taken with a pipette and dried. The dried material was then extracted with 2.0 ml of petroleum ether and evaporated to a volume 0.05 ml. This was subjected to thin-layer chromatography, in which Silica Gel H (E. Merck, Darmstadt, Germany) (20 by 20 cm; 0.25 mm thick) and a solvent, n-propanol-n-butanol-water-ammonia (57: 20: 20: 3, in volume), were used as an ascending system. The radioactive spots in the thin-layer were scanned by an automatic thin-layer chromatography scanner (Nihon-Musen, Tokyo) (Range, 3,000 cpm/10 seconds or 1,000 cpm/30 seconds; slit, 30×3 mm; scanning speed, 300 mm/hour; chart speed, 150 mm/hour). The petroleum ether used was a product of the Katayama Chemical

\* From the National Chubu Hospital, Obu, Aichi 474 Japan.

Co., Osaka (specific gravity, 0.62–0.67), and the L-<sup>35</sup>S-methionine used was a product of the New England Nuclear, Boston, Mass., U.S.A. (specific activity, 1006.3 Ci/mmol).

### 1. Differentiation of *M. nonchromogenicum* from *M. terrae* and *M. triviale*.

All test strains of *M. nonchromogenicum* showed one strong radioactive spot at the Rf value 0.70–0.80, while all strains of *M. terrae* and *M. triviale* showed no spot or, if any, a residual spot at the Rf value 0.95 (Fig. 1, A and B).

### 2. Differentiation of *Rhodococcus* from *Nocardia*.

Out of the rhodococci tested, *R. aurantiacus* and *R. bronchialis* could be differentiated from all rhodococci and nocardiae by showing prominent radioactive spots. All test strains of *R. aurantiacus* showed one strong radioactive spot at the Rf value 0.95 (Fig. 1, C), and all test strains of *R. bronchialis* showed one strong radioactive spot at the Rf value 0.10 and another weak radioactive spot at the Rf value 0.50 (Fig. 1, D). Other rhodococci showed only weak radioactive spots at the Rf values 0.10 or 0.95 or both (Fig. 1, E), or lacked spot. In contrast, all test strains of nocardiae did not show radioactive spot (Fig. 1, F).

## 緒 言

前に、東村・水野<sup>1-3)</sup>は、抗酸菌 (*Mycobacterium*) を <sup>35</sup>S-methionine と incubate した後、三塩化醋酸 (TCA) で菌体を処理した後、エチルエーテル・エタノール混液で抽出した抽出液を濃縮して薄層クロマトグラフィー (TLC) にかけると、放射性 spots 分布がほぼ菌種特有の pattern を示すことを報告した。同様な方法は、*Rhodococcus* と *Nocardia* の属の区別にも有用であつた<sup>4)</sup>。しかしながら、エチルエーテル・エタノール混液による抽出では、種々の <sup>35</sup>S 含有化合物が抽出されることが考えられるので、今回は、対象を石油エーテル可溶分に限定して、その分類・同定における意義を観察してみた。その結果、この画分に含まれる <sup>35</sup>S 由来放射性物質の有無の検討は、*Rhodococcus* および *Nocardia* の同定および一部の抗酸菌の同定に有用であることがわかつた。

## 実験方法

被検株としては、表 1 に示す 45 株の菌株を使用した。被検株は 37°C (*Nocardia* は 28°C) に 5 日間培養して使用した。本研究に用いた抗酸菌 3 菌種は、いずれも遅発育性であるので、37°C に 14 日間培養した。発育した菌を白金耳でとつて、ガラス玉コルベンに入れて 3 分間振盪して均一化した後、約 4.0 ml の生食水 (0.9% NaCl 溶液) で 3 回洗浄した。洗浄菌体を無菌的に秤量し、湿重量 100 mg を次の反応液に加えて、ガラス棒で管壁に菌をこすりつけながら混和した後、37°C に 24 時間培養した。反応液は、次のとおりで、4.0 ml ずつ遠心管に分注した。M/15 磷酸緩衝液 (pH 7.1) に、sodium acetate, 10 μg/ml, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 100 μg/ml, および L-<sup>35</sup>S-methionine, 10 μCi/ml を含有するもの。

37°C 24 時間培養後に、遠心 (500×g, 15 分) して菌を集め、5.0 ml の蒸留水で 3 回洗浄した後、菌体に 3.0 ml のエチルエーテル—エタノール (1:1, 容量比) 混液を加えて 5 分間混和し、液層を遠心分離した。次に同混液 3.0 ml で更に 1 回抽出し、両抽出液を合して 37°C のフラン器に放置して抽出液を蒸発させた。抽出液の量が約 0.1 ml となつたときに、これに 4.0 ml の石油エーテルと 2.0 ml の蒸留水を加えて混和し、上層の石油エーテル層をピペットで採取し、試験管に移して 37°C で蒸発させた。管底の乾固物に 2.0 ml の石油エーテルを加えて溶解し、これを再び蒸発させて濃縮し、濃縮物をマイクロピペットで約 1/5 とつて薄層 (Silica Gel H, Merck, Darmstadt) (20×20 cm, 0.25 mm 厚さ) のにせ、次の溶液で上昇法で展開した。n-propanol—n-butanol—water—ammonia (57:20:20:3, 容量比)。薄層クロマト上の放射性 spots の位置は、日本無線製薄層クロマト・スキャンナーで記録した。記録条件は、scanning speed, 300 mm/hour; chart speed, 150 mm/hour; slit, 30×3 mm で、range と time constant は、3,000 counts per minute (cpm)/10 seconds または 1,000 cpm/30 seconds を用いた。

使用した L-<sup>35</sup>S-methionine は、New England Nuclear, Boston, Massachusetts, U.S.A. の製品 (specific activity, 1006.3 Ci/m mol) である。また石油エーテルは、片山化学製を使用した (比重 0.62–0.67)。

なお薄層クロマトの手法の詳細は前報した<sup>1)</sup>。

## 実験結果および考察

1. *Mycobacterium nonchromogenicum* と *M. terrae* および *M. triviale* の区別  
*M. nonchromogenicum* の被検株は、5 株全部が Rf 値

Table 1. Strains Used in the Present Study

Species	Strain	Other designations
<i>Mycobacterium nonchromogenicum</i>	09003	ATCC 19530; NCTC 10424; type
	09013	ATCC 19531
	09033	ATCC 19533; NCTC 10479
	09024	
	09025	
<i>Mycobacterium terrae</i>	38013	ATCC 15755; type
	38020	ATCC 25113
	38021	ATCC 25146
	38022	ATCC 25147
	38023	ATCC 25149
<i>Mycobacterium triviale</i>	37001	A1b 2386
	37004	ATCC 19386; C5181
	37013	ATCC 19387; T254-3
	37014	T255-3
	37015	T319-3
<i>Rhodococcus bronchialis</i>	50003	ATCC 25592; NCTC 10667; type
	50006	
	50011	
<i>Rhodococcus rubroprotinctus</i>	60003	ATCC 25593; NCTC 10668
	60004	
	60006	
<i>Rhodococcus terrae</i>	70001	
	70006	ATCC 25594; NCTC 10669; type
	70007	
<i>Rhodococcus ruber (lentifragmentus)</i>	23002	M-1
	23021	M-103
	23024	M-192
<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	40001	ATCC 13808; type
	40016	ATCC 4276
	40017	ATCC 4273
<i>Rhodococcus aurantiacus (Gordona aurantiaca)</i>	80001	ATCC 25938; NCTC 10741; type
	80003	
	80004	
<i>Nocardia asteroides</i>	23006	M-93
	23007	M-94
	23012	M-145
<i>Nocardia farcinica</i>	23013	M-146
	23025	C-407
	23036	M-81
	23040	M-111
<i>Nocardia brasiliensis</i>	23083	M-199
<i>Nocardia caviae</i>	23005	M-73
	23076	M-180
	23111	R-416
	23112	R-547

ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, U.S.A.; NCTC, National Collection of Type Cultures, London; Strains with 'M' and 'C' were received from Dr. I. Uesaka, Kyoto University, Kyoto (these strains belonged to the collection of Dr. N.M. McClung, University of South Florida, Tampa, Florida, U.S.A.); Strains with 'R' were received from Dr. R.E. Gordon, Rutgers State University, New Brunswick New Jersey, U.S.A.

0.70~0.80に著明な単一の radioactive spot を示した(図1, A)。これに対して, *M. terrae* の5株および *M. triviale* の5株は, すべて著明な spot を示さなかつた。たとえ, あつたとしても *Rf* 値 0.95 付近の痕跡的な spot にすぎなかつた(図1, B)。

上述の標準条件では, *M. terrae* および *M. triviale* に

は, spot は認められないか, あつても痕跡的 spot にすぎない。しかし range および slit を, より sensitive な次の条件に変えると, 弱い radioactive spot が認められるようになった。Range 300 cpm, slit 30×6 mm, time constant 30 seconds。ただし認められた spot の放射能は, この条件で 50 cpm を越さなかつた(注: *M. non-*

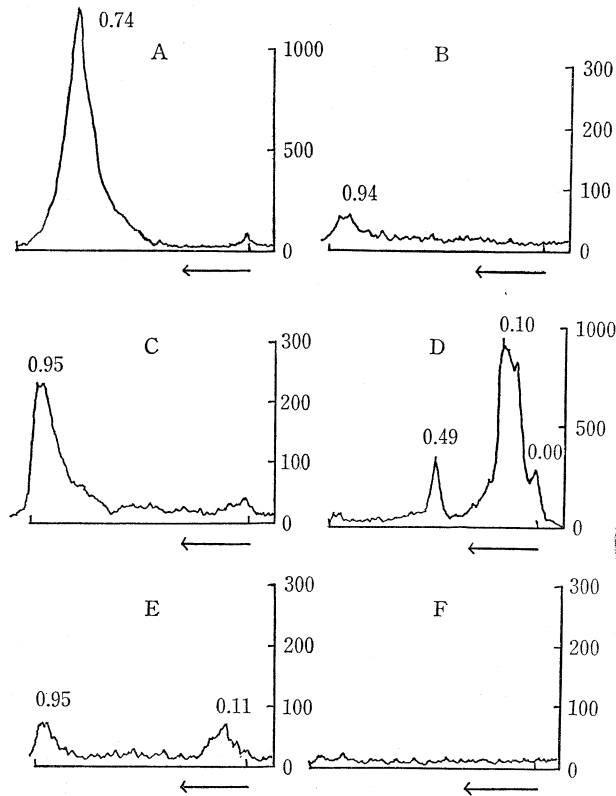


Fig. 1. Radioactive spots of petroleum ether-soluble fraction of mycobacteria, rhodococci, and nocardiae in thin-layer chromatography after incubation with  $^{35}\text{S}$ -methionine.

(A) *Mycobacterium nonchromogenicum* strain 09003; (B) *Mycobacterium triviale* strain 37004; (C) *Rhodococcus aurantiacus* (*Gordona aurantiaca*) strain 80004; (D) *Rhodococcus bronchialis* strain 50003; (E) *Rhodococcus terrae* strain 70006; (F) *Nocardia farcinica* strain 23040. The vertical scale at the right side shows the radioactivity as counts per minute.

*chromogenicum* の radioactive spot の peak の高さは、より狭い slit の使用で、1,000 cpm を越す)。

*M. triviale* の中で、#37014 以外の 4 株は、Rf 値 0.95 に痕跡的 spot を示した。*M. terrae* は、#38013 は spot なし、#38020 および #38021 は Rf 値 0.80 付近に 1 つの痕跡的 spot、#38022 および #38023 は Rf 値 0.94 に痕跡的 spot を示した。

## 2. *Rhodococcus* species 間の区別

本報で用いた 6 種の *Rhodococcus* の中で *R. aurantiacus* は、3 株とも Rf 値 0.95 に明瞭単一の radioactive spot を示すことにより、他の *Rhodococcus* と区別できた (図 1, C)。この Rf 値 0.95 の spot は、*Mycobacterium* に類々みられるもので<sup>2)</sup>、この菌種の特異的な位置を示唆している。

次に *R. bronchialis* も 3 株とも、Rf 値 0.10 に、peak 高 1,000 cpm に達する強い radioactive spot、そして

Rf 値 0.50 付近に放射能の弱いもう 1 つの spot を示すことにより、明瞭に他の *Rhodococcus* から区別できた (図 1, D)。

他の *Rhodococcus*、すなわち *R. rubropertinctus*、*R. terrae*、*R. ruber*、および *R. rhodochrous* の 4 者は、著明な spot を示さず、radioactive spot を示さぬか、たとえ示しても、Rf 値 0.10 および 0.95 のいずれか、または両方に痕跡的 spot(s) を示すにすぎなかつた (図 1, E)。

## 3. *Nocardia* と *Rhodococcus* の区別

*Rhodococcus* 属の菌は、*R. aurantiacus* と *R. bronchialis* とが著明な spot(s) を示し、他の菌種も類々痕跡的な spot(s) を示したのに対し、*Nocardia* は、上記標準条件では spot を示さなかつた (図 1, F)。より sensitive な条件で観察しても、*N. caviae* の 2 株 (23111 と 23112) が Rf 値 0.42~0.46 に根跡的 spot を示したにすぎなかつた。

## 考 察

1. *Mycobacterium nonchromogenicum* と *M. terrae* および *M. triviale* の区別

この3者は、2,3の生化学性状によつて区別できるとされているが、一方では、全体として共通の性状が多い<sup>5)-10)</sup>。したがつて実際問題として、簡単な同定方式では区別が困難で、頻々 *M. nonchromogenicum* complex<sup>11)</sup> と呼ばれている(注:米国では *M. terrae* complex と呼ばれている。しかし、complex名は、それに含まれる菌種の中で、年代的に一番早いものの名をとるのが通則であるゆえ、この場合、*M. nonchromogenicum* complex が妥当と思われる。ちなみに、*M. nonchromogenicum*<sup>13)</sup>、*M. terrae*<sup>14)</sup>、*M. triviale*<sup>15)</sup> の発表年代は、1965年、1966年、1970年である)。

この3者の生化学的区別法としては、nicotinamidase<sup>16)-18)</sup>、pyrazinamidase<sup>16)-18)</sup>、耐熱性 acid phosphatase<sup>10)</sup>、42°Cの発育<sup>19)</sup>などがあげられているが、いずれも決定的な区別法とはいえない<sup>19)</sup>。

その点、本法で示した <sup>35</sup>S-methionine 取り込み後の薄層クロマトグラフィー(石油エーテル抽出画分使用)は、最も明瞭確実な区別法と思われる。本法で、*M. nonchromogenicum* は、他の *M. terrae* および *M. triviale* から明確に区別できる。ただし *M. terrae* と *M. triviale* の区別はできない。前に Tsukamura<sup>17)</sup> も述べたごとく、この両者の関係は今も明瞭に区別されてはいない。

なお、著者の前の報告<sup>11,13)</sup>では、*M. nonchromogenicum* からのエチルエーテル・エタノール抽出画分の薄層クロマトで Rf 値 0.95 付近に放射性 spot があり、後の実験で<sup>19)</sup>、この spot の物質を石油エーテルで抽出できることがわかった。一方、今回の実験では、薄層クロマトの溶媒は同一であるのに、石油エーテル抽出画分の示す spot の Rf 値は 0.70~0.80 で、前の実験と少し違っていた。この原因として、菌の trichloroacetic acid (TCA) 処理の有無が考えられる。前の実験では、抽出前に10% TCA 液で菌を2回処理したが、今回の実験では、TCA 処理を行わずに、菌から直接石油エーテルで抽出を行なった。

2. *Rhodococcus* 菌種間の区別

*Rhodococcus* 属は、Tsukamura (1974年)<sup>20)</sup> および Goodfellow and Alderson (1977年)<sup>21)</sup> の提唱で設立された(系統細菌学国際委員会(1980年)<sup>22)</sup>)。この属の菌種間の区別については、今までの研究でかなり明らかにされているが<sup>20)21)23)24)</sup>、本報の研究で、*R. aurantiacus* と *R. bronchialis* が特異な spot 分布 pattern を示して、他の菌種と明瞭に区別されることが明らかにされた。

3. *Rhodococcus* と *Nocardia* の区別

*Rhodococcus* の菌種の中の大部分が、元々 *Nocardia* に

入れられていた歴史が示すように<sup>20)21)25)</sup>、*Rhodococcus* と *Nocardia* の区別は必ずしも容易ではない。この両者の区別については、最近東村<sup>26)</sup>が展望を述べたが、今回、本報で得た成績は、両者の区別点に新しい知見を加えたものと思われる。すなわち *Rhodococcus* は、石油エーテル抽出画分の薄層クロマトで、Rf 値 0.10 付近および Rf 値 0.95 付近の両方または一方に放射性 spot(s) を示すのに対して、*Nocardia* は、このような spot を示さない。

## 結 論

<sup>35</sup>S-methionine と菌とを incubate した後に、石油エーテル抽出画分を薄層クロマトグラフィーにかけると、*Rhodococcus* は Rf 値 0.10 および Rf 値 0.95 の一方または両方に放射性 spot(s) を示すのに対して、*Nocardia* は、このような spot を示さない。この点によつて、両者の区別が可能である。

また *Rhodococcus* の中で、*R. bronchialis* と *R. aurantiacus* は、おのおの特異な放射性 spots を示すことにより、他の菌種と区別できる。

更に *Mycobacterium nonchromogenicum*、*M. terrae* および *M. triviale* の3者は、互いに類似する抗酸菌であるが、*M. nonchromogenicum* のみは、石油エーテル抽出画分の薄層クロマトで、Rf 値 0.70~0.80 に著明な放射性 spot を示すのに対して、*M. terrae* および *M. triviale* は、このような spot を示さない。この点で、*M. nonchromogenicum* を他の2者と区別することができる。

## 文 献

- 1) Tsukamura, M. and Mizuno, S.: Int. J. Syst. Bacteriol., 25: 271, 1975.
- 2) 東村道雄・水野松司: 結核, 53: 85, 1978.
- 3) 東村道雄・水野松司: 結核, 54: 15, 1979.
- 4) Tsukamura, M. and Mizuno, S.: J. Gen. Microbiol., 105: 159, 1978.
- 5) Tsukamura, M.: Japan. J. Microbiol., 15: 229, 1971.
- 6) Kubica, G. P. et al.: J. Gen. Microbiol., 74: 159, 1973.
- 7) Meissner, G. et al.: J. Gen. Microbiol., 83: 207, 1974.
- 8) Stanford, J. L. and Grange, J. M.: Tubercle, 55: 143, 1974.
- 9) Tsukamura, M.: Int. J. Syst. Bacteriol., 26: 409, 1976.
- 10) Saito, H. and Masai, H.: J. Clin. Microbiol., 11: 97, 1980.
- 11) 東村道雄: 結核, 55: 341, 1980.
- 12) Runyon, E. H. et al.: Manual of Clinical Microbiology, edited by E. H. Lennette, E. H. Spaulding and J. P. Traut, p. 148, American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1974.
- 13) 東村道雄: 医学と生物学, 71: 110, 1965.
- 14) Wayne, L. G.: Amer. Rev. Respir. Dis., 93: 919,

- 1966.
- 15) Kubica, G.P. et al.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 20: 161, 1970.
- 16) Käppler, W.: *Zeitschr. Tuberk. Erk. Thoraxorg.*, 129: 321, 1968.
- 17) Käppler, W.: *Zeitschr. Erk. Atmungsorg.*, 135: 39, 1971.
- 18) Tsukamura, M.: *Japan. J. Microbiol.*, 15: 229, 1971.
- 19) 東村道雄他: *結核*, 55: 407, 1980.
- 20) Tsukamura, M.: *Japan. J. Microbiol.*, 18: 37, 1974.
- 21) Goodfellow, M. and Alderson, G.: *J. Gen. Microbiol.*, 100: 99, 1977.
- 22) Skerman, V. B. D. et al.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 30: 225, 1980.
- 23) Tsukamura, M.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 28: 169, 1978.
- 24) Tsukamura, M. et al.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 29: 110, 1979.
- 25) Tsukamura, M. et al.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 25: 377, 1975.
- 26) 東村道雄: *結核*, 55: 289, 1980.